

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 4 月 22 日 (22.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/032966 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00,
31/198, 31/205, 39/395, A61P 35/00, 43/00

治村 永井 1 5 3 番地 2 中外製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013061

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 御町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 10 日 (10.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-298701
2002 年 10 月 11 日 (11.10.2002) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都 北区 浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 畠中 貴弘 (HATANAKA,Takahiro) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 大泉 厳雄 (OHIZUMI,Iwao) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 根津 淳一 (NEZU,Jun-ichi) [JP/JP]; 〒300-4101 茨城県 新治郡新

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL GROWTH REGULATOR

(54) 発明の名称: 細胞増殖抑制剤

(57) Abstract: Using L-2-phenylglycine which is seemingly an amino acid transporter ATB⁰⁺ inhibitor as a test substance, a human colon cancer cell line and a human mammary cancer cell line are subjected to a cell growth test. As a result, a concentration-dependent effect of regulating cell growth is found out. This fact indicates that cell growth can be regulated by inhibiting the activity of ATB⁰⁺. It is expected that the regulation of the amino acid transporter ATB⁰⁺ activity is usable as an important indicator in developing a growth regulator for cancer cells and the like.

(57) 要約: アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺の阻害剤の一つと考えられるL-2-フェニルグリシンを被検物質として、ヒト大腸癌株および乳癌株に対しての細胞増殖試験を行い、濃度依存的な細胞増殖抑制効果を見出した。このことはATB⁰⁺の活性を阻害することにより、細胞増殖を抑制しうることを示すものである。癌細胞などの増殖抑制剤の開発において、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺の活性の抑制は重要な指標となると考えられる。

BEST AVAILABLE COPY

- 1 -

明細書

細胞増殖抑制剤

5 技術分野

本発明は、アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤に関する。

背景技術

10 哺乳動物は、生体外から栄養源を取り込む必要性があり、細胞には多くの輸送タンパク質が存在することが知られている。アミノ酸の輸送を行っているのはアミノ酸トランスポーター（アミノ酸輸送タンパク質）であり、現在までに多数のアミノ酸トランスポーターが見出されている（非特許文献1参照）。

アミノ酸トランスポーターは天然アミノ酸だけでなく、L- α -メチルドーパ、NO
15 S阻害剤などの薬剤の輸送にも関与していることが報告されている（非特許文献2及び3参照）。

ATB^{0,+}は、小腸、肺および乳腺に発現するアミノ酸輸送体である。機能的には、ATB^{0,+}は、Na⁺およびCl⁻駆動型中性および塩基性アミノ酸輸送システムである。これは、腸管におけるアミノ酸の吸収において重要な役割を果たしている（非特許
20 文献1参照）。ヒトATB^{0,+}のクローニングが最近報告されている（非特許文献4参照）。現時点で、ATB^{0,+}の輸送機能は、基質としてのアミノ酸についてのみ研究されている。その輸送機能は非常に集積力が強く、Na⁺およびCl⁻の膜内外濃度勾配ならびに、膜電位差によりエネルギー供給されている。ATB^{0,+}は、アミノ酸（例えば、グリシンおよびプロリン）、神経伝達物質（例えば、モノアミンおよびGABA）、なら
25 びに浸透圧調節物質（osmolyte）（例えば、タウリンおよびベタイン）のような様々な化合物に対するNa⁺およびCl⁻駆動型輸送体の遺伝子ファミリーに属する。構造

- 2 -

的に、ATB^{0,+}は、GABA輸送体およびベタイン輸送体に非常に密に関連している。

ATB^{0,+}は、アミノ酸642個からなる12回膜貫通型タンパクである(非特許文献4)。
また、ヒト-マウス間でのアミノ酸レベルでの相同性は88%であり、TM3-4の細胞
外領域における相同性は77%である。ATB^{0,+}の生理機能は、中性および塩基性アミ
5 ノ酸(非特許文献4および5参照)や、D-アミノ酸(非特許文献6)、カルニチン(非特
許文献7)等を2分子のナトリウムイオンおよび1分子の塩素イオンとの共輸送によ
り細胞内に運搬し、消化管における栄養物質の効率的な吸収や、細胞内への物質
の効率的な取り込みに関与していると考えられている。

また、抗原のATB^{0,+}の遺伝子およびタンパク質に関しては、PCT出願(特許文献
10 1)が存在し該出願ではATB^{0,+}はグリシントランスポーターとして記載されてい
る。

ヒトにおいてATB^{0,+}は以下の臓器で発現している。Master blot (mRNA, Clontec
h) ; 肺、気管、唾液腺(高)、乳腺、胃、下垂体(低)、大腸、子宮、精巣、前
立腺(更に低い)(非特許文献4)。

15 また、マウスにおいてATB^{0,+}は以下の臓器で発現している。Northern blot ;
大腸(高)、肺(低)(非特許文献5および8参照)。免疫染色 ; 大腸(非特許文献
6参照)、肺、気管(全て管腔側)(Mager, in PharmaConference 2001, Interlake
n, Switzerlandにて発表)。

しかしながら、ATB^{0,+}の癌細胞増殖への関与は不明であり、ATB^{0,+}の機能を阻
20 害することにより癌細胞の増殖に影響を与えるか否かの議論は行われていなかっ
た。

〔特許文献1〕国際公開第2000/14221号パンフレット

〔非特許文献1〕Ganapathy, V. 著, 'In Current Topics in Membranes. Ed. Ba
rrett, K. E. and Donowitz, M., 2001年, Vol. 50, p. 379-412

25 〔非特許文献2〕Osieckaら著, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1987年, Vol. 242, p.
443-449

- 3 -

〔非特許文献 3〕 Hatanakaら著, Pharm. Res., 1999年, Vol. 16, p. 1770-1774

〔非特許文献 4〕 Sloan, J. L., Mager, S. 著, J. Biol. Chem., 1999年, Vol. 274, p. 23740-23745

〔非特許文献 5〕 Hatanakaら著, J. Clin. Invest. 2001年, Vol. 107, p. 1035-10

5 43

〔非特許文献 6〕 Hatanakaら著, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002年, Vol. 291, p. 291-295

〔非特許文献 7〕 Nakanishiら著, J. Physiol., 2001年, Vol. 532 (2), p. 297-304

〔非特許文献 8〕 Ugawaら著, Am. J. Physiol., 2001年, Vol. 281, G365-G370

10

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤、特に大腸癌などの癌細胞増殖抑制剤を提供することにある。

15 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。L-2-フェニルグリシン (phenylglycine) は、強いATB⁰⁺活性を示すイヌ小腸刷子縁膜で、類似のL-アラニン (alanine) およびL-ファニルアラニン (phenylalanine) に比べ強いアフィニティーを示すことから、ATB⁰⁺に特異性の強い競合的阻害剤であると考えられる (Hatanaka et al. 2002, J. Pharm. Pharmacol.)。本発明者らは、ATB⁰⁺の阻害
20 剤の一つと考えられるL-2-フェニルグリシンを被検物質として、ヒト大腸癌株SW60、HT-29および乳癌株MCF-7に対しての細胞増殖試験を行った。その結果、SW60においてはL-2-フェニルグリシンによる細胞増殖抑制が認められなかった。一方、HT-29及びMCF-7においてはL-2-フェニルグリシン濃度依存的な細胞増殖抑制が認められた。RT-PCRの結果から、MCF-7およびHT-29ではATB⁰⁺の発現が高く、SW60に
25 においてはATB⁰⁺は検出限界以下であった。以上より、L-2-フェニルグリシンによる細胞増殖抑制は、非特異的細胞毒性ではなくATB⁰⁺の機能阻害によることが示

- 4 -

唆された。

上記の如く本発明者らは、アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}の活性を阻害することにより、細胞増殖を抑制することが可能であることを見出し、本発明を完成させた。本発明者らによって見出された知見により、アミノ酸トランスポーターA
5 TB^{0,+}を標的として、細胞増殖抑制剤を開発することが可能となった。即ち、本発明者らによって見出された知見は、アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}の活性を阻害することにより、細胞増殖を抑制しうることを示すものである。癌細胞などの増殖抑制剤の開発において、アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}の活性の抑制は重要な指標となるものと考えられる。本発明の細胞増殖抑制剤は、癌（例えば、大
10 腸癌、乳癌等）の増殖の抑制に利用されることが大いに期待される。

本発明は、アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤に関し、より具体的には、

〔1〕 アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤、

15 〔2〕 アミノ酸トランスポーターがNa⁺およびCl⁻駆動型アミノ酸トランスポーターである、〔1〕に記載の細胞増殖抑制剤、

〔3〕 アミノ酸トランスポーターがATB^{0,+}である、〔1〕に記載の細胞増殖抑制剤、

20 〔4〕 アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}阻害物質が、アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}に結合することによりアミノ酸トランスポーターATB^{0,+}の輸送機能を阻害する物質である、〔1〕に記載の細胞増殖抑制剤、

〔5〕 アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}阻害物質が、L-アミノ酸、NOS阻害剤、フェニルグリシン誘導体、カルチニン、D-アミノ酸、もしくはアミノ酸を基礎とするプロドラッグからなる群、あるいは、これらの誘導体化合物群
25 より選択される、〔1〕に記載の細胞増殖抑制剤、

〔6〕 アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}阻害物質がアミノ酸トランスポーターA

- 5 -

TB⁰⁺に結合する抗体である、〔1〕に記載の細胞増殖抑制剤、

〔7〕 アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺に結合する抗体が、細胞傷害活性を有する抗体である、〔6〕に記載の細胞増殖抑制剤、

〔8〕 細胞傷害活性が抗体依存性細胞介在性細胞傷害活性（ADCC活性）である、

5 〔7〕に記載の細胞増殖抑制剤、

〔9〕 補体依存性細胞傷害活性（CDC活性）を有する抗体である、〔7〕に記載の細胞増殖抑制剤、

〔10〕 アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺阻害物質がアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺の発現を抑制する物質である、〔1〕に記載の細胞増殖抑制剤、

10 〔11〕 癌細胞の増殖を抑制する、〔1〕～〔10〕のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤、

〔12〕 癌細胞が大腸癌細胞、膵臓癌細胞または乳癌細胞である、〔11〕に記載の細胞増殖抑制剤、

を提供するものである。

15 本発明は、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤を提供する。本発明の細胞増殖抑制剤の標的となるアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺は、Na⁺およびCl⁻駆動型アミノ酸トランスポーターであり、中性または塩基性アミノ酸 (Sloan et al., J. Biol. Chem., 274, p23740-23745, 1999, Hatanaka et al., J. Clin. Invest., 107, p1035-1043, 2001) や、D-アミノ酸 (Hatanaka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 291, p291-295, 2002)、カルニチン (Nakanishi et al., J. Physiol., 532, 2, p297-304, 2001) 等を2分子のナトリウムイオンおよび1分子の塩素イオンとの共輸送により細胞内に運搬し、消化管における栄養物質の効率的な吸収や、細胞内への物質の効率的な取り込みに関与しているものと考えられている。

25 アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺タンパク質のアミノ酸配列および該タンパク質をコードする遺伝子 (GenBankアクセッションNo. 151978) の塩基配列は既に公

知である。

本発明のアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺阻害物質は、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺を介した輸送を阻害し、細胞の増殖を抑制するもの、あるいはアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺に結合し、細胞傷害活性により細胞の増殖を抑制するものであれば、特に限定されない。アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺を介した輸送を阻害する物質としては、例えば、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺に結合してアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺の輸送機能を阻害する物質、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺の発現を抑制する物質などが挙げられるが、好ましいのはアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺に結合してアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺の輸送機能を阻害する物質である。

本発明におけるアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺阻害物質としては、例えば、合成低分子化合物、抗体、タンパク質、ペプチド、天然化合物等が挙げられるが、具体的には、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチン (Carnitine)、D-アミノ酸、もしくはアミノ酸を基礎とするプロドラッグ (Amino acid-based prodrugs)、あるいは、これらの誘導体等を例示することができる。

本発明におけるNOS阻害剤としては、好ましくは中性または塩基性L- α -アミノ酸構造を基本構造とするNOS阻害剤であり、より好ましくはL-アルギニン (arginine)、L-リジン (lysin)、L-シトルリン (citrulline)、またはL-オルニシン (ornithine) を基本構造とするNOS阻害剤であり、さらに好ましくはアルギニン、リジン、シトルリン、オルニシン、L-NNA (N^G-nitro-L-arginine)、L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester)、L-NMHA (N^G-monomethyl-L-homoarginine)、L-NDMA (N^G, N^{G'}-dimethyl-L-arginine)、L-NMEA (N^G-monoethyl-L-arginine)、L-NMMA (N^G-monomethyl-L-arginine)、L-NABE (N^G-L-nitro-L-arginine benzyl ester)、L-NIL (L-N⁶-(1-iminoethyl)-lysine)、L-TC (L-thiocitrulline)、L-MTC (S-methyl-L-thiocitrulline)、L-NIO (L-N⁵-(1-iminoethyl)-ornithine)、GGA (α -guanidinoglutaric acid)、またはカナバニン (canavanine) である。

また、本発明のフェニルグリシンもしくはその誘導体としては、通常、フェニルグリシン構造を有するドラッグもしくはプロドラッグであり、好ましくはフリーの α アミノ酸および α カルボキシル基を有するフェニルグリシン誘導体（生理的なpHにおいて酸性化合物ではない）、もしくは3-または4-カルボキシフェニルグリシンを含む3-または4-カルボキシルエステルプロドラッグであり、さらに好ましくはL-2-フェニルグリシンである。

また、本発明のカルニチンもしくはその誘導体としては、好ましくはカルニチンもしくはそのアシルエステルであり、より好ましくは、カルニチン、アセチルカルニチン、プロピオニルカルニチンである。

また、本発明におけるD-アミノ酸 (amino acids) としては、好ましくはD-アラニン (alanine)、D-セリン (serine)、D-メチオニン (methionine)、D-ロイシン (leucine)、D-トリプトファン (tryptophan)、D-スレオニン (threonine)、D-ヒスチジン (histidine)、D-フェニルアラニン (phenylalanine)、D-グルタミン (glutamine)、またはこれらの誘導体であり、より好ましくはD-アラニン、D-セリン、D-メチオニン、D-ロイシン、D-トリプトファン、またはこれらの誘導体であり、さらに好ましくはD-アラニン、D-セリン、D-メチオニン、D-ロイシン、D-トリプトファンである。

また、本発明におけるアミノ酸を基礎とするプロドラッグとしては、好ましくはアミノ酸官能基（D-またはL-アミノ酸を含む）を有するプロドラッグであり、より好ましくはアスパラギン酸もしくはグルタミン酸を有する β -カルボキシルエステルプロドラッグもしくは γ -カルボキシルエステルプロドラッグ、または、中性もしくは塩基性アミノ酸を有する α -カルボキシルエステルプロドラッグである。

本発明において、上記化合物は必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識等を挙げることができる。

また本発明の好ましい態様におけるアミノ酸トランスポーターATB^{0,+}阻害物質としては、アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}タンパク質に対する抗体である。該

- 8 -

抗体は、通常、ATB^{0,+}タンパク質を認識して結合する。

本発明の細胞増殖抑制剤に含有される抗体はアミノ酸トランスポーターATB^{0,+}と結合する限り特に制限はない。好ましくはアミノ酸トランスポーターATB^{0,+}と特異的に結合する抗体であり、さらに好ましくは細胞傷害活性を有する抗体である。

本発明における細胞傷害活性とは、例えば抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (anti body-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) 活性、補体依存性細胞傷害 (complement-dependent cytotoxicity: CDC) 活性などを挙げることができる。本発明において、CDC活性とは補体系による細胞傷害活性を意味し、ADCC活性とは標的細胞の細胞表面抗原に特異的抗体が付着した際、そのFc部分にFc γ 受容体保有細胞（免疫細胞等）がFc γ 受容体を介して結合し、標的細胞に傷害を与える活性を意味する。

抗アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}抗体がADCC活性を有するか否か、又はCDC活性を有するか否かは公知の方法により測定することができる（例えば、Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E. Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc., (1993) 等）。

具体的には、まず、エフェクター細胞、補体溶液、標的細胞の調製を行う。

(1) エフェクター細胞の調製

CBA/Nマウスなどから脾臓を摘出し、RPMI1640培地 (GIBCO社製) 中で脾臓細胞を分離する。10%ウシ胎児血清 (FBS、HyClone社製) を含む同培地で洗浄後、細胞濃度を $5 \times 10^6/\text{ml}$ に調製し、エフェクター細胞を調製する。

(2) 補体溶液の調製

Baby Rabbit Complement (CEDARLANE社製) を10% FBS含有培地 (GIBCO社製) にて10倍希釈し、補体溶液を調製する。

(3) 標的細胞の調製

脾臓癌細胞株 (AsPC-1、Capan-2等) を0.2mCiの⁵¹Cr-sodium chromate (Amersham

Pharmacia Biotech社製)とともに、10% FBS含有DMEM培地中で37℃にて1時間培養することにより放射性標識する。放射性標識後、細胞を10% FBS含有RPMI1640培地にて3回洗浄し、細胞濃度を $2 \times 10^5/\text{ml}$ に調製して、標的細胞を調製する。

次いで、ADCC活性、又はCDC活性の測定を行う。ADCC活性の測定の場合は、96ウェルU底プレート (Beckton Dickinson社製) に、標的細胞と、抗アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺抗体を50 μl ずつ加え、氷上にて15分間反応させる。その後、エフェクター細胞100 μl を加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。抗体の終濃度は0または10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とする。培養後、100 μl の上清を回収し、ガンマカウンター (COBRA IIAUTO-GMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company社製) で放射活性を測定する。細胞傷害活性 (%) は $(A-C) / (B-C) \times 100$ により求めることができる。Aは各試料における放射活性 (cpm)、Bは1% NP-40 (半井社製) を加えた試料における放射活性 (cpm)、Cは標的細胞のみを含む試料の放射活性 (cpm) を示す。

一方、CDC活性の測定の場合は、96ウェル平底プレート (Becton Dickinson社製) に、標的細胞と、抗アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺抗体を50 μl ずつ加え、氷上にて15分間反応させる。その後、補体溶液100 μl を加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。抗体の終濃度は0または3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とする。培養後、100 μl の上清を回収し、ガンマカウンターで放射活性を測定する。細胞傷害活性はADCC活性の測定と同様にして求めることができる。

本発明の細胞増殖抑制剤の有効成分として使用される抗体は、抗原 (アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺タンパク質またはその部分ペプチド) と結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は当業者に周知の方法により作製することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用

- 10 -

し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製できる。

抗原の調製は公知の方法、例えばバキュロウイルスを用いた方法（W098/46777 など）等に準じて行うことができる。

ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。

また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。具体的には、ハイブリドーマの mRNA から逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V 領域）の cDNA を合成する。目的とする抗体の V 領域をコードする DNA が得られれば、これを所望の抗体定常領域（C 領域）をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体の V 領域をコードする DNA を、抗体 C 領域の DNA を含む発現ベクターへ組み込んでもよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製

- 11 -

造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと

5 連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

20 また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平1-59878参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望

25 のヒト抗体を取得することができる (国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照)。さらに、

- 12 -

ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

抗体遺伝子を一旦単離し、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いることができる。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS, ミエローマ、BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, (2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (*Nicotiana*) 属、例えばニコティアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。

また、本発明の抗体は、抗体変異体であってもよい。本発明において、抗体変異体とは、1またはそれ以上のアミノ酸残基が改変された、抗体のアミノ酸配列バリ

- 13 -

アントを指す。どのように改変されたアミノ酸バリエーションであれ、元となった抗体と同じ結合特異性を有すれば、本発明における「抗体変異体」に含まれる。このような変異体は、抗体の重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインのアミノ酸配列と少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列相同性または類似性を有するアミノ酸配列と100%よりも少ない配列相同性、または類似性を有する。

また、本発明の上記抗体はアミノ酸トランスポーターATB⁰+タンパク質と結合し、該タンパク質の機能を阻害するかぎり、抗体の断片またはその修飾物であってもよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖もしくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)が挙げられる。具体的には、これらFab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖もしくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)、をコードする遺伝子を発現ベクターに導入後、適当な宿主細胞で発現させる(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A. H., Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press Inc., Plueckthun, A. & Skerra, A., Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press Inc., Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669, Bird, R. E. et al., TIB TECH (1991) 9, 132-137参照)。scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリinkerを介して連結される(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリinkerとしては、例えば12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖またはL鎖V領域をコードするDNAのうち、それら

- 14 -

の配列のうちの全部または所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリinker部分をコードするDNA、およびその両端が各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってscFvを得ることができる。これらの抗体断片は、前記と同様にして遺伝子を取得し発現させ、宿主により產生させることができる。抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（PEG）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。本発明における「抗体」にはこれらの抗体も包含される。

さらに、本発明で使用する抗体は二重特異性抗体（bispecific antibody）であってもよい。二重特異性抗体はアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺分子上の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を有する二重特性抗体であってもよいし、一方の抗原結合部位がアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺を認識し、他方の抗原結合部位が放射性物質、化学療法剤、細胞由来トキシン等の細胞傷害性物質を認識してもよい。この場合、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺を発現している細胞に直接細胞傷害性物質を作用させ腫瘍細胞に特異的に傷害を与え、腫瘍細胞の増殖を抑制することが可能である。二重特異性抗体は2種類の抗体のHL対を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製し、得ることもできる。さらに、遺伝子工学的手法により二重特異性抗体を作製することも可能である。

前記のように発現、産生された抗体は、通常のタンパク質の精製で使用されている公知の方法により精製することができる。例えば、プロテインAカラムなどの

アフィニティーカラム、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

- 5 抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) の測定には公知の手段を使用することができる。例えば、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。

- 10 特定の分子が本発明のアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺に結合するか否かは、当業者においては公知の方法により測定することができる。公知の方法としては、例えば、免疫沈降法、ウエストウエスタンブロッティング法、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法)、蛍光免疫法、表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを用いた方法、などが挙げられる。

- 15 このようなアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺への結合活性を指標に、本発明の細胞増殖抑制剤の候補化合物をスクリーニングすることが可能である。具体的には、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺に被検試料を接触させ、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺と被検試料との結合を検出し、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺に結合する化合物を選択すればよい。被検試料としては特に制限はなく、例えば、
20 細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製もしくは粗精製タンパク質 (抗体を含む)、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。アミノ酸トランスポーターは、例えば、精製したタンパク質として、担体に結合させた形態として、他のタンパク質との融合タンパク質として、細胞膜上に発現させた形態として、膜画分として
25 被検試料に接触させることができる。このようにして得られたアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺に結合する化合物から、本発明の細胞増殖抑制剤の有力な候補を

- 16 -

選択するために、これら化合物がアミノ酸トランスポーターATB^{0,+}の輸送機能を阻害するか否かを検出することが有用である。特定の分子がアミノ酸トランスポーターの輸送機能を阻害しているか否かは、公知の方法、例えば、放射性物質（¹⁴Cなど）、蛍光物質などでアミノ酸などの基質を標識し、該基質がアミノ酸トランスポーター発現細胞に取り込まれた量を測定すること等により判断することができる。

本発明の細胞増殖抑制剤の有効成分としては、アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}の発現を抑制する物質を使用することもできる。このような物質としては、例えば、アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドなどが挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}をコードするDNAまたはmRNAのいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくはアミノ酸トランスポーターのDNAまたはmRNA中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができ、例えば、メチルホスホネート型やエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体またはホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

本発明の細胞増殖抑制剤の標的となる細胞としては特に制限はないが、好ましくは大腸癌、乳癌、膵臓癌等の癌細胞であり、特に好ましくは大腸癌細胞または乳癌細胞である。

本発明の細胞増殖抑制剤は、細胞増殖に起因する疾患、特に大腸癌あるいは乳癌等の癌の治療、予防を目的として使用される。

アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}は上述のように、血管側の細胞膜では発現し

- 17 -

ていないことから、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺阻害物質（例えば、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺に結合する抗体）は、正常組織のアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺機能を阻害することなく、例えば、大腸癌等の癌細胞に対して、特異的に作用するものと考えられる。また、大腸癌等の癌細胞におけるアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺の異常は、生理的機能から推察すると、癌細胞増殖に伴うタンパク質合成に必要なアミノ酸の取り込み亢進に関与しているものと考えられる。従って、本発明の細胞増殖抑制剤は、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺阻害物質による栄養遮断を薬効とする新規抗癌剤となるものと考えられる。また、本発明の好ましい態様における、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺に結合する抗体を有効成分とする細胞増殖抑制剤は、該抗体がATB⁰⁺に特異的に結合し腫瘍細胞に対して傷害性を持つ細胞を活性化させる作用（抗体依存性細胞傷害活性；ADCC活性）、あるいは補体タンパク質による細胞破壊作用（補体依存性細胞傷害活性；CDC活性）による殺作用を薬効とする新規抗癌剤となるものと期待される。

本発明の薬剤の製剤化にあたっては、常法に従い、必要に応じて薬学的に許容される担体を添加することができる。例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着色料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体を適宜使用することができる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を挙げる事ができる。

上記薬剤の剤型の種類としては、例えば経口剤として錠剤、粉末剤、丸剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、軟・硬カプセル剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、

舌下剤、ペースト剤等、非経口剤として注射剤、坐剤、経皮剤、軟膏剤、硬膏剤、外用液剤等が挙げられ、当業者においては投与経路や投与対象等に応じた最適の剤型を選ぶことができる。

- 本発明の細胞増殖抑制剤は、経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001~100000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の治療薬はこれらの投与量に制限されるものではない。また、発明の治療薬は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U. S. A）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

図面の簡単な説明

- 図1は、各種癌細胞株におけるアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺の発現状態を示す写真である。写真左は、D1プライマーとD2プライマーの組み合わせでPCRを行った場合、写真右は、D5プライマーとD6プライマーの組み合わせでPCRを行った場合の写真である。ウェル番号と細胞株の対応は以下のようにになっている（表1）。

- 19 -

表 1

TCP 1	A549	Lung	TCP 14	DU-145	Prostate	TCP 27	BxPC-3	Pancreas
TCP 2	NCI-H460	Lung	TCP 15	PC-3	Prostate	TCP 28	Capan-1	Pancreas
TCP 3	NCI-H23	Lung	TCP 16	LNCap.FGC	Prostate	TCP 29	MIA PaCa-2	Pancreas
TCP 4	NCI-H522	Lung	TCP 17	22Rv1	Prostate	TCP 30	PANC-1	Pancreas
TCP 5	HT-29	Colon	TCP 18	BALL-1	Leukemia	TCP 31	AsPC-1	Pancreas
TCP 6	LS 174T	Colon	TCP 19	P39/TSU	Leukemia			
TCP 7	COLO 205	Colon	TCP 20	KU812	Leukemia			
TCP 8	LoVo	Colon	TCP 21	CCRF-CEM	Leukemia			
TCP 9	SW620	Colon	TCP 22	JOK-1	Leukemia			
TCP 10	MCF7	Breast	TCP 23	Daudi	Lymphoma			
TCP 11	MDA-MB-231	Breast	TCP 24	EB-3	Lymphoma			
TCP 12	ZR-75-1	Breast	TCP 25	Ramos	Lymphoma			
TCP 13	BT-474	Breast	TCP 26	P3HR-1	Lymphoma			

尚、TCP1はウェル1に、TCP2はウェル2にそれぞれ対応する。Nは鋳型DNAを加え
 5 なかった場合、Gはヒト染色体DNAを加えた場合をそれぞれ表わす。

図2は、L-2-フェニルグリシンの各種癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

10 以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例1〕 ヒトATB⁰⁺ RT-PCR解析

(1-1) 全RNAの調製

15 次のヒト癌細胞株より、ISOGEN (ニッポンジーン社)、あるいはTRIzol (Invitrogen社) を用いて、それぞれのメーカー推奨の標準的な方法に従いtotal RNAを調製した。

・肺癌細胞株：A549、NCI-H460、NCI-H23、NCI-H522

・大腸癌：HT-29、LS 174T、COLO 205、LoVo、SW620

20 ・乳癌細胞株：MCF7、MDA-MB-231、ZR-75-1、BT-474

・前立腺癌細胞株：DU-145、PC-3、LNCap.FGC、22Rv1

- 20 -

- ・白血病細胞株：BALL-1、P39/TSU、KU812、CCRF-CEM、JOK-1
- ・リンフォーマ細胞株：Daudi、EB-3、Ramos、P3HR-1
- ・膵臓癌細胞株：BxPC-3、Capan-1、MIA PaCa-2、PANC-1、AsPC-1

5 (1-2) RT-PCR解析

上記の全RNAより、SUPERScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen社) を用い、メーカー推奨の標準的な方法に従い、1本鎖cDNAを合成した。逆転写反応のプライマーとしてはオリゴdT (12~18mer) を用いた。このcDNAの一部を鋳型とし、ヒトATB⁰⁺遺伝子に特異的なプライマーを用いて、以下の

10 条件によりPCR解析を行った。

<反応液組成>

- ・ TaKaRa ExTaq (TaKaRa社) 0.3 μ L
- ・ TaqStart™ Antibody (CLONTECH社) 0.3 μ L
- 15 ・ 10x ExTaqバッファー (TaKaRa社) 3 μ L
- ・ 2.5mM dNTPs (TaKaRa社) 2.4 μ L
- ・ 20 μ Mプライマー 各0.6 μ L
- ・ 鋳型cDNA 3 μ L
- ／全量 30 μ L

20

<反応条件>

- ・ 94℃、2分→(94℃、30秒→68℃、2分) x 35サイクル→72℃、5分

<プライマー>

- 25 ・ D1 : 5'- cag ttt cag ttt gga gga ttc ttc -3' (配列番号 : 1)
- ・ D2 : 5'- tta ctc cag tct cat tca ttc cac -3' (配列番号 : 2)

- 21 -

・ D5 : 5' - ctg ctt ggt ttt gtt tct cct tgg -3' (配列番号 : 3)

・ D6 : 5' - aat cat aca cca gcc taa agc aac -3' (配列番号 : 4)

PCRの結果を図1に示した。大腸癌細胞5株(レーン5-9)のうち、2株(HT-29、
5 LS174T)で強い発現が認められた。また、Lovo細胞でも中程度の発現が認められ
た。乳癌細胞4株(レーン10-13)では、全ての細胞でATB⁰⁺の発現が認められ、そ
のうちMCF7とBT-474で強い発現が認められた。膵臓癌細胞5株(レーン27-31)の
うち、2株(BxPC-3、Capan-1)で強い発現が認められた。癌はheterogeneousであ
るにもかかわらず、図1のように大腸癌、乳癌、膵臓癌では40%以上の細胞株にA
10 TB⁰⁺が高発現しており、臨床でも同様に40%以上の大腸癌、乳癌、膵臓癌患者の
腫瘍部位にATB⁰⁺が高発現している可能性が示唆された。

〔実施例2〕 L-2-Phenylglycineのヒト大腸癌株SW60、HT29および乳癌株MCF-7
に対する細胞増殖抑制作用

15 L-2-フェニルグリシン(phenylglycine)は強いATB⁰⁺活性を示すイヌ小腸刷子縁
膜で類似のL-アラニン(alanine)およびL-フェニルアラニン(phenylalanine)に比
べ強いアフィニティーを示すことから、ATB⁰⁺に特異性の強い競合的阻害剤である
と考えられる(Hatanaka et al. 2002, J. Pharm. Pharmacol.)。L-2-フェニルグ
リシンを0%FBSを含む培地で溶解し、20mM L-2-フェニルグリシン溶液を調製した。
20 培地としてはSW60、HT29にはIMDMを、MCF-7にはRPMIを用いた。また、この溶液を
培地で希釈して2、0.2、0.02ならびに0.002mM L-2-フェニルグリシン溶液を調製
した。

ヒト大腸癌株SW60、HT29および乳癌株MCF-7を培地でそれぞれ 4×10^6 、 1.6×10^6 、
 1.6×10^6 細胞/mLに調製した。この懸濁液25 μ L/well(それぞれ 1×10^5 、 4×10^4 、 4
25 $\times 10^4$ 細胞)にあらかじめ12% FBSを含む培地 25 μ L/wellを添加しておいた96well
プレートに蒔き、50 μ LのL-2-Phenylglycine溶液を添加した。5% CO₂インキュベ

- 22 -

ーターで培養し、培養4日目に生細胞数をMTS assayで定量化した。

図2に細胞増殖試験結果を示した。SW60においてはL-2-Phenylglycineによる細胞増殖抑制が認められなかった。一方、HT29およびMCF-7においては濃度依存的な細胞増殖抑制が認められた。HT29における細胞増殖抑制は10 μ M L-2-Phenylglycine存在下で約10%を示し、平衡に達した。MCF-7における細胞増殖抑制は1mM L-2-Phenylglycine存在下で約10%であった。

RT-PCRの結果から、MCF-7およびHT29ではATB⁰⁺の発現が高く、SW60においてはATB⁰⁺は検出限界以下であった（図1）。以上より、L-2-フェニルグリシンによる細胞増殖抑制は、非特異的細胞毒性ではなくATB⁰⁺の機能阻害によると考えられた。

10

産業上の利用の可能性

本発明により、アミノ酸トランスポーターATB⁰⁺の活性を阻害する物質は細胞増殖を抑制する効果があることが見出された。これによりアミノ酸トランスポーターATB⁰⁺を標的として、細胞増殖抑制剤を開発することが可能となった。このような細胞増殖抑制剤は、癌（例えば、大腸癌等）の増殖の抑制に利用されることが大いに期待される。

15

- 23 -

請求の範囲

1. アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤。
- 5 2. アミノ酸トランスポーターがNa⁺およびCl⁻駆動型アミノ酸トランスポーターである、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。
3. アミノ酸トランスポーターがATB^{0,+}である、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。
- 10 4. アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}阻害物質が、アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}に結合することによりアミノ酸トランスポーターATB^{0,+}の輸送機能を阻害する物質である、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。
5. アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}阻害物質が、L-アミノ酸、NOS阻害剤、フェニルグリシン誘導体、カルチニン、D-アミノ酸、もしくはアミノ酸を基礎とするプロドラッグからなる群、あるいは、これらの誘導体化合物群より選
15 択される、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。
6. アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}阻害物質がアミノ酸トランスポーターATB^{0,+}に結合する抗体である、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。
7. アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}に結合する抗体が、細胞傷害活性を有する抗体である、請求項6に記載の細胞増殖抑制剤。
- 20 8. 細胞傷害活性が抗体依存性細胞介在性細胞傷害活性（ADCC活性）である、請求項7に記載の細胞増殖抑制剤。
9. 補体依存性細胞傷害活性（CDC活性）を有する抗体である、請求項7に記載の細胞増殖抑制剤。
10. アミノ酸トランスポーターATB^{0,+}阻害物質がアミノ酸トランスポーターATB^{0,+}の発現を抑制する物質である、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。
25
11. 癌細胞の増殖を抑制する、請求項1～10のいずれかに記載の細胞増殖

- 2 4 -

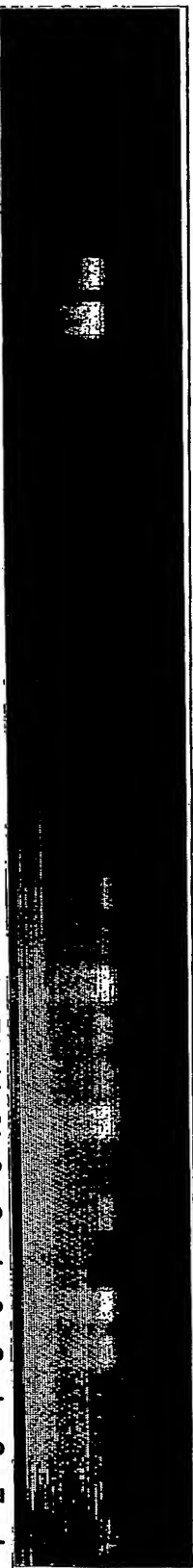
抑制剤。

- 1 2. 癌細胞が大腸癌細胞、膵臓癌細胞または乳癌細胞である、請求項 1 1 に記載の細胞増殖抑制剤。

1 / 2

☒ 1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 N G



hATB0+; D1 + D2

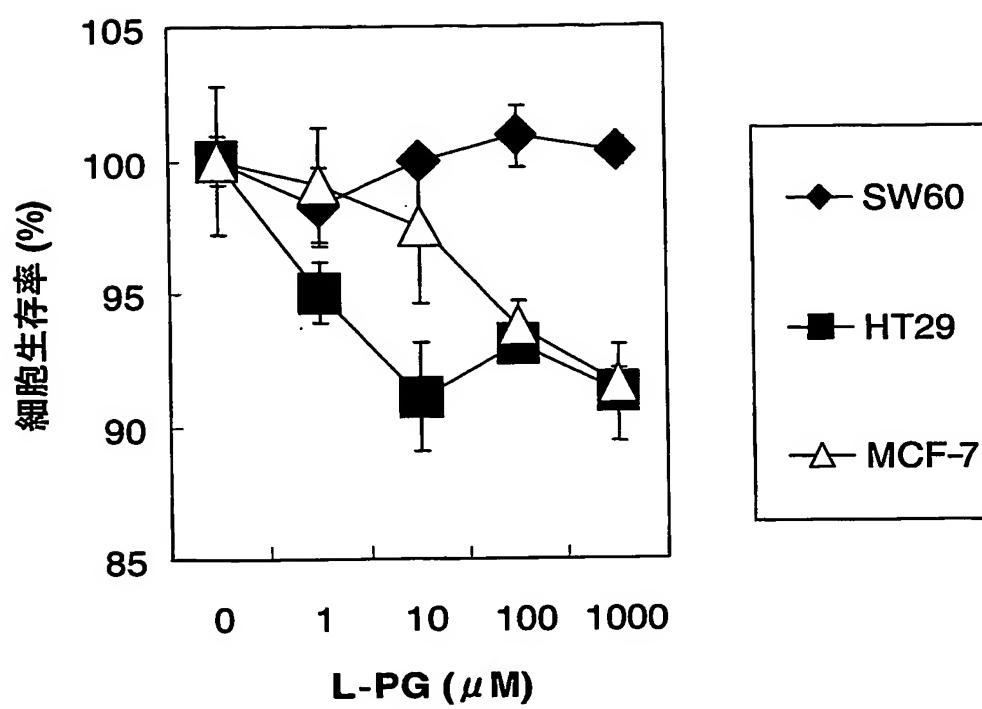
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 N G



hATB0+; D5 + D6

2 / 2

図 2



1 / 3

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Agent for inhibiting cell proliferation

<130> C1-A0222P

<150> JP 2002-298701

<151> 2002-10-11

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 1

cagtttcagt ttggaggatt cttc

2 / 3

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 2

ttactccagt ctcattcatt ccac

24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 3

ctgcttggtt ttgtttctcc ttgg

24

<210> 4

3 / 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 4

aatcatcac cagcctaaag caac

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/13061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/198, 31/205, 39/395, A61P35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/198, 31/205, 39/395, A61P35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	BODE, Barrie P. et al., Role of glutamine transporter ATB ⁰ in human hepatic and colon cancer cell growth, FASEB Journal, 2001, Vol.15, No.4, pp.A435; particularly, 395.10	1-4, 6-12 5
X Y	FUCHS, Bryan Christopher et al., Inducible antisense inhibition of glutamine transporter ATB ⁰ expression arrests growth in human hepatoma cells., FASEB Journal, March 2002, Vol.16, No.4, pp.A456, particularly, 388.8	1-4, 6-12 5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
13 January, 2004 (13.01.04)

Date of mailing of the international search report
03 February, 2004 (03.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13061

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Database Biosis on STN, BioScience Information Service (Philadelphia, PA, USA), No.PREV200200408849, CHEN, Seiyu et al., Evidences of human stanniocalcin 1 and amino acid transporter ATB ^{0,+} as potential diagnostic marker for non-small cell lung cancer., Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, March 2002, Vol.43, pages 518 to 519	1-4, 6-12 5
Y	HATANAKA, T. et al., A study of the substrate specificity of Na ⁺ -dependent and Na ⁺ -independent neutral amino acid transport systems in dog intestinal brush-border membrane vesicles using L-alanine analogues, J.Pharm.Pharmacol., April 2002, page 54, No.4, pp.549-54; particularly, abstract	5
Y	HATANAKA, T. et al., Transport of N ^G -nitro-L-arginine across intestinal brush border membranes by Na ⁺ -dependent and Na ⁺ -independent amino acid transporters, Pharm.Res., 1999, Vol.16, No.11, pp.1770-4; particularly, abstract	5
Y	HATANAKA, Takehiro et al., Na ⁺ - and Cl ⁻ -coupled active transport of nitric oxide synthase inhibitors via amino acid transport system B ^{0,+} , Journal of Clinical Investigation, 2001, Vol.107, No.8, pages 1035 to 1043; particularly, abstract	5
Y	GANAPATHY, Vadivel et al., Na ⁺ - and Cl ⁻ -coupled transport of carnitine by the amino acid transporter ATB ^{0,+} , FASEB Journal, 2001, Vol.15, No.4, pp.A435; particularly, 395.11	5
Y	NAKANISHI, Takeo et al., Na ⁺ - and Cl ⁻ -coupled active transport of carnitine by the amino acid transporter ATB ^{0,+} from mouse colon expressed in HRPE cells and Xenopus oocytes, Journal of Physiology, 2001, Vol.532, No.2, pages 297 to 304; particularly, abstract	5
Y	HATANAKA, Takahiro et al., Transport of D-Serine via the Amino Acid Transporter ATB ^{0,+} Expressed in the Colon, Biochemical and Biophysical Research Communications, February 2002, Vol.291, No.2, particularly, abstract	5
P,A	WO 02/083060 A2 (MEDICAL COLLEGE OF GEORGIA RESEARCH INSTITUTE, INC.), 24 October, 2002 (24.10.02), & WO 02/083060 A3	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13061

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-12
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet(1)

The inventions according to claims 1 to 12 are use inventions relating to a substance which is defined as a desired property, i.e., being an amino acid transporter ATB^{0,+} inhibitor. Although claims 1 to 12 employ any substances having the above property as the active ingredient, nothing but phenylglycine, which corresponds to only a small part of the substances specified by the above claims, is supported by the description in accordance with the definition of PCT Article 6 and disclosed therein in accordance with the definition of PCT Article 5.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of the substances having the property as being an amino acid transporter ATB^{0,+} inhibitor cannot be specified. Thus, claims 1 to 12 do not comply with the requirement of clearness in accordance with PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made on those containing phenylglycine as the active ingredient.

Continuation of Box II of continuation of first sheet(1)

Claims 1 to 12 relate to a cell growth regulator comprising an amino acid transporter ATB^{0,+} inhibitor as the active ingredient. Since such a cell growth regulator comprising an amino acid transporter ATB^{0,+} inhibitor as the active ingredient is not novel, the technical feature of claims 1 to 12 resides in a cell growth regulator containing a specific amino acid transporter ATB^{0,+} inhibitor as the active ingredient. Accordingly, there is no technical relevancy among claims 1 to 12 exceeding prior art and thus there is no single general inventive concept common to them. Such being the case, there are 5 groups of inventions, i.e., the same number as the number of the groups of substances as set forth in the claims, as follows.

1. Claims 1 to 12 (parts)

Cell growth regulators containing an L-amino acid as the active ingredient.

2. 1. Claims 1 to 12 (parts)

Cell growth regulators containing an NOS inhibitor as the active ingredient.

1. Claims 1 to 12 (parts)

Cell growth regulators containing a phenylglycine derivative as the active ingredient.

1. Claims 1 to 12 (parts)

Cell growth regulators containing carnitine as the active ingredient.

1. Claims 1 to 12 (parts)

Cell growth regulators containing a D-amino acid as the active ingredient.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' A61K45/00, 31/198, 31/205, 39/395, A61P35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' A61K45/00, 31/198, 31/205, 39/395, A61P35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN), REGISTRY(STN), JICST(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	BODE, Barrie P. et al., Role of glutamine transporter ATB ⁰ in human hepatic and colon cancer cell growth, FASEB Journal, 2001, Vol.15, NO.4, pp. A435 特に、395.10	1-4, 6-12 5
X Y	FUCHS, Bryan Christopher et al., Inducible antisense inhibition of glutamine transporter ATB ⁰ expression arrests growth in human hepatoma cells., FASEB Journal, March 2002, Vol.16, NO. 4, pp. A456 特に、388.8	1-4, 6-12 5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.01.04

国際調査報告の発送日

03.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

浅田 浩吉 印

4C 9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Database Biosis on STN, BioScience Information Service (Philadelphia, PA, USA), No.PREV200200408849, CHEN, Seiyu et al., Evidences of human stanniocalcin 1 and amino acid transporter ATB ⁰⁺ as potential diagnostic marker for non-small cell lung cancer. , Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, March 2002, Vol.43, pp.518-519.	1-4, 6-12 5
Y	HATANAKA, T. et al, A study of the substrate specificity of Na ⁺ - dependent and Na ⁺ -independent neutral amino acid transport systems in dog intestinal brush-border membrane vesicles using L-alanine analogues, J. Pharm. Pharmacol., April 2002, pp.54, No.4, pp.549-54 特に、Abstract	5
Y	HATANAKA, T. et al, Transport of N ⁰ -nitro-L-arginine across intestinal brush border membranes by Na ⁺ -dependent and Na ⁺ - independent amino acid transporters, Pharm. Res., 1999, Vol.16, No.11, pp.1770-4 特に、Abstract	5
Y	HATANAKA, Takahiro et al., Na ⁺ - and Cl ⁻ -coupled active transport of nitric oxide synthase inhibitors via amino acid transport system B ⁰⁺ , Journal of Clinical Investigation, 2001, Vol.107, No.8, pp.1035-1043 特に、Abstract	5
Y	GANAPATHY, Vadivel et al., Na ⁺ - and Cl ⁻ -coupled transport of carnitine by the amino acid transporter ATB ⁰⁺ , FASEB Journal, 2001, Vol.15, No.4, pp. A435 特に、395.11	5
Y	NAKANISHI, Takeo et al., Na ⁺ - and Cl ⁻ -coupled active transport of carnitine by the amino acid transporter ATB ⁰⁺ from mouse colon expressed in HRPE cells and Xenopus oocytes, Journal of Physiology, 2001, Vol.532, No.2, pp.297-304 特に、Abstract	5
Y	HATANAKA, Takahiro et al., Transport of D-Serine via the Ami no Acid Transporter ATB ⁰⁺ Expressed in the Colon, Biochemical and Biophysical Research Communications, February 2002, Vol. 291, No.2 特に、Abstract	5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	WO 02/083060 A2(MEDICAL COLLEGE OF GEORGIA RESEARCH INSTITUTE, INC.)2002.10.24 & WO 02/083060 A3	1-12

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (P C T 1 7 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-12 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
別紙参照。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6. 4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

別紙参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第 I 欄 1 の続き

請求の範囲 1-12 は、アミノ酸トランスポーター A T B⁰・+阻害物質という所望の性質により定義された物質の用途発明に係るものである。そして、請求の範囲 1-12 は、そのような性質を有するあらゆる物質を有効成分として採用するものとなるが、P C T 第 6 条の規定のとおり明細書に裏付けられ、P C T 第 5 条の規定のとおり開示されているのは、フェニルグリシンのみである以上、上記請求の範囲によって特定される物質のうちごくわずかな部分にすぎない。

また、アミノ酸トランスポーター A T B⁰・+阻害物質は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する物質を特定することができるとも認められないから、請求の範囲 1-12 は、P C T 第 6 条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、フェニルグリシンを有効成分とするものについて行った。

第 II 欄の続き

請求の範囲 1-12 は、アミノ酸トランスポーター A T B⁰・+阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤であるが、アミノ酸トランスポーター A T B⁰・+阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤は新規なものでない以上、請求の範囲 1-12 の技術的特徴は、特定のアミノ酸トランスポーター A T B⁰・+阻害物質を含有する細胞増殖抑制剤となる。よって、請求の範囲 1-12 は、相互間に先行技術以上の技術的な関係がなく、共通する単一の一般的発明概念は存在しなくなり、下記のとおり請求の範囲のそれぞれに記載された物質群の数と同数の 5 つの発明が存在する。

1. 請求の範囲 1-12 (一部)
L-アミノ酸を有効成分とする細胞増殖抑制剤。
2. 請求の範囲 1-12 (一部)
N O S 阻害剤を有効成分とする細胞増殖抑制剤。
1. 請求の範囲 1-12 (一部)
フェニルグリシン誘導体を有効成分とする細胞増殖抑制剤。
1. 請求の範囲 1-12 (一部)
カルニチンを有効成分とする細胞増殖抑制剤。
1. 請求の範囲 1-12 (一部)
D-アミノ酸を有効成分とする細胞増殖抑制剤。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.